

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 19120051301916

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

青霉 HLKG-44 次级代谢产物研究及磷二肽  
的合成与质谱研究

Study on the Secondary Metabolites from *Penicillium*  
HLKG-44 and the Synthesis and ESI-MS Analysis  
of Phospho-dipeptides

张 瀚 文

指导教师姓名: 赵玉芬 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2008 年 月

论文答辩日期: 2008 年 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2008 年 8 月

厦门大学博硕士论文摘要库

**Study on the Secondary Metabolites from  
*Penicillium* HLKG-44 and the Synthesis and ESI-MS  
Analysis of Phospho-dipeptides**

Dissertation Submitted to  
**Xiamen University**  
in partial fulfillment of the requirement  
for the degree of  
**Master of Natural Science**

By  
**Hanwen Zhang**

Dissertation Supervisor: Prof. Yu-Fen Zhao  
At  
Department of Chemistry, Xiamen University  
**August, 2008**

厦门大学博士论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

厦门大学博硕士论文摘要库

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

厦门大学博士论文摘要库



## 摘 要

天然产物具有广泛的生物活性，是人们获得药物的主要途径之一。微生物广泛地分布于整个生物圈，具有丰富多样的代谢产物，是天然药物的一个重要的来源。本论文以沙溪河污染地分离得到的一株具有抗肿瘤活性的青霉菌作为研究菌株，希望通过对其发酵、分离得到具有抗肿瘤活性的次级代谢产物。

我们对青霉菌HLKG-44 进行发酵培养并采用不同的分离方法对其脂溶性次级代谢产物进行初步分离分析，分离出 6 个化合物，进一步通过核磁( $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、DEPT、HSQC、HMBC等)、质谱、单晶衍射、红外和元素分析等方法确定化合物的结构。对化合物进行了抗肺肿瘤细胞A549 的活性测试，结果显示其中的两个化合物具有比较好的抗肿瘤活性，半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ ) 分别是 0.02  $\mu\text{g/mL}$ 和 18.9  $\mu\text{g/mL}$ 。

磷不仅在生命代谢和遗传过程中起着重要的作用，而且在生命起源、发育以及所有生命化学过程中都扮演重要的角色。磷化学与生命活动有着非常密切的关系。研究表明，膦肽作为一类含磷化合物具有抑制植物生长、抑制癌细胞生长、抗烟草花叶病毒的活性，同时也是丝氨酸蛋白酶类(如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、凝血酶、粒酶、二肽基肽酶等)的一类重要的抑制剂。这些酶在体内代谢中具有重要作用，通过这类化合物的研究，可为药物开发建立基础。

本文探索出产率好、成本低、简单有效的无溶剂合成膦二肽前体氨基亚膦酸酯 (APP) 的方法。合成了 5 个新型膦二肽化合物，并对其进行了结构鉴定。通过磷谱、HPLC、晶体衍射及圆二色分析方法对膦二肽合成过程中的氨基酸选择性与 APP 反应进行研究，表明 Trp 和 Pro 对消旋的 (R/S) -APP 具有完全的选择性，Ile、Val 及 Phe 只具有部分的选择性。对膦二肽 ESI-MS 的裂解规律进行研究，发现和验证其两个特殊的重排。以胃蛋白酶为模型研究其抑制丝氨酸蛋白酶的活性，表明该类化合物并没有抑制活性，对其他类丝氨酸蛋白酶的抑制作用有待于进一步研究。

**关键词：**污染环境微生物 次级代谢产物 氨基亚膦酸酯 膦二肽

厦门大学博士论文摘要库

## Abstract

Natural medicines are the primary access to drugs because of the wide range of biological activity. Microbes, being widely distributed throughout the biosphere, are important natural medicine sources for their rich and varied metabolic products. In this paper, a kind of *penicillin* with anti-tumor activity, which is isolated from the polluted area of Shaxi River, is studied. It is expected to obtain the secondary metabolites with anti-tumor activity through fermentation and separation from the *penicillin* HLKG-44.

After fermentation the *penicillin* HLKG-44, we isolate and analyze its lipophilic constituents. Six compounds were isolated by different isolation methods, then identification their chemical structure by NMR ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT, HSQC, HMBC, etc.), MS, X-ray diffraction, infra-red, elemental analysis and other methods. The result of the anti-lung tumor cells A549 test showed that two of the compounds have better anti-tumor activity, 50 % inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) were  $0.02\ \mu\text{g} / \text{mL}$  and  $18.9\ \mu\text{g} / \text{mL}$  respectively.

Phosphorus play an important role not only in the metabolic and genetic process, but also in the origin, growth and all other chemical process of life. Previous study shows that phosphono-peptides, as one type of phospho compounds, can inhibit plant growth, the growth of cancer cells, anti-tobacco mosaic virus activity, and also a major inhibitor of serine protease (such as trypsin, chymotrypsin, thrombin, granzyme, uPA, and so on). These enzymes play an important role in the metabolism. Based on the study of such compounds, it is expected to provide an important basis for the drug development.

A high production, low cost, simple and effective solvent-free synthesis method to obtain the phosphonic dipeptide precursor amino-phosphonate (APP) is proposed in this paper. Five kinds of new phospho-dipeptides are synthesized, their structure are identified. Through the spectrum of phosphorus ( $^{31}\text{P}$  NMR), HPLC, crystal diffraction and circular dichroism analysis, selective of amino acids and APP reaction ability in the synthesis process is studied. The results showed that tryptophan and proline show selectivity for one of the optical isomer of APP, while isoleucine, valine and phenylalanine show only partial selectivity. The fragment rule of ESI-MS for phospho-dipeptides was studied and two special rearrangements were verified. Research of the serine proteinase activity based on the model of pepsin showed that these

compounds do not have significant inhibition activity. Inhibition of other types of serine protease will be studied further.

**Keywords:** polluted environment microbes, secondary metabolites, amino-phosphonate, phospho-dipeptides

## 缩写符号表

符号	英文含义	中文含义
AA	Amino Acid	氨基酸
APP	(Amino-phenyl-methyl)-phosphonic acid diisopropyl ester	(氨基苯基) 二异丙基亚膦酸酯
Boc	tert-Butyl Carbonoxyl	叔丁氧羰基
CD	Circular Dichroism	圆二色
CID	Collision Induced Dissociation	碰撞诱导解离
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide	二环己基碳二亚胺
DIPPH	diisopropyl phosphite	二异丙基亚磷酸酯
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry	电喷雾电离质谱
HMBC	( <sup>1</sup> H-detected)heteronuclear multiple-bond correlation	(检出 <sup>1</sup> H的)异核多键相关
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole	1-羟基-苯并三氮唑
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry	高分辨质谱
HSQC	( <sup>1</sup> H-detected)heteronuclear sigle quantum correlation	(检出 <sup>1</sup> H的)异核多键相关
Ile	Isoleucine	异亮氨酸
LC	Liquid Chromatography	液相色谱
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization	基质辅助激光解吸电离
MTT	Methyl Thiazolytetrazolium	甲基四唑蓝 (噻唑蓝)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	核磁共振
Phe	Phenylalanine	苯丙氨酸
Pro	Proline	脯氨酸
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N,N-tetramethyluronium tetrafluoroborate	O-苯并三氮唑-N, N, N', N'-四甲基脲四氟硼酸酯
THF	Tetrahydrofuran	四氢呋喃
TOF-MS	Time of Flight Mass Spectrometry	飞行时间质谱
Trp	Trptophane	色氨酸
Val	Valine	缬氨酸
Z-Cl	Benzyloxycarbonyl Chloride	氯甲酸苄酯

厦门大学博士论文摘要库

# 目录

摘 要 .....	i
英文摘要 .....	iii
缩写符号表 .....	v
第一章 前 言 .....	1
1.1 天然药物研究 .....	1
1.1.1 来源 .....	1
1.1.2 活性 .....	2
1.2 真菌的次级代谢产物 .....	4
1.3 膦肽的活性 .....	7
1.4 膦肽的合成研究 .....	10
1.4.1 P-C键形成 .....	10
1.4.2 膦酯肽中肽键形成 .....	14
1.5 现代质谱 .....	16
1.6 课题意义 .....	18
第二章 青霉HLKG-44 次级代谢产物研究 .....	21
2.1 引言 .....	21
2.2 实验部分 .....	21
2.2.1 试剂材料 .....	21
2.2.2 仪器 .....	22
2.2.3 实验方法 .....	22
2.3 结果与分析 .....	25
2.3.1 化合物P1 .....	25
2.3.2 化合物P2 .....	29
2.3.3 化合物P3 .....	33
2.3.4 化合物P4 .....	35

2.3.5 化合物P5.....	37
2.3.6 化合物P6.....	41
<b>2.4 菌株HLKG-44 产物P1 和P3 的验证 .....</b>	<b>43</b>
2.4.1 方法.....	43
2.4.2 结果与讨论 .....	43
<b>2.5 化合物抗肿瘤活性测试.....</b>	<b>44</b>
2.5.1 肿瘤细胞培养 .....	44
2.5.2 抗肿瘤活性测定 .....	45
2.5.3 结果 .....	45
<b>2.6 小结.....</b>	<b>46</b>
<b>第三章 膦二肽的合成与质谱研究.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 引言.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 膦二肽的合成.....</b>	<b>47</b>
3.2.1 试剂材料 .....	47
3.2.2 仪器 .....	47
3.2.3 合成研究及数据 .....	47
<b>3.3 反应的选择性.....</b>	<b>57</b>
3.3.1 磷谱分析 .....	57
3.3.2 HPLC分析.....	58
3.3.3 晶体衍射分析 .....	60
3.3.4 圆二色 (CD) 分析 .....	64
<b>3.4 膦二肽的电喷雾质谱研究.....</b>	<b>65</b>
3.4.1 实验条件 .....	65
3.4.2 结果与讨论 .....	66
<b>3.5 活性测试.....</b>	<b>72</b>
3.5.1 方法 .....	72
3.5.2 试剂.....	72
3.5.3 步骤.....	72



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库